

10/541702

PCT/JP2003/000105

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

09.1.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 1月10日

REC'D 27 FEB 2004

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-004813
[ST. 10/C]: [JP2003-004813]

WIPO

PCT

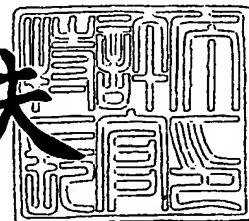
出 願 人
Applicant(s): 三菱ウェルファーマ株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月13日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3008933

【書類名】 特許願
【整理番号】 A31023A
【提出日】 平成15年 1月10日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県射水郡小杉町南太閤山 2-2 医薬大宿舍 5-2
 02
 【氏名】 川上 純一
【特許出願人】
 【識別番号】 000006725
 【氏名又は名称】 三菱ウェルファーマ株式会社
【代理人】
 【識別番号】 110000109
 【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス
 【代表者】 今村 正純
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 170347
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
【ブルーフの要否】 要

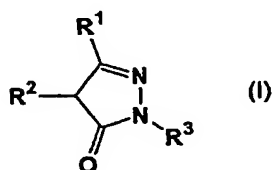
【書類名】 明細書

【発明の名称】 血液脳関門破綻抑制剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記式 (I) :

【化 1】



(式中、R¹は、水素原子、アリール基、炭素数1～5のアルキル基又は総炭素数3～6のアルコシカルボニルアルキル基を表し；R²は、水素原子、アリールオキシ基、アリールメルカプト基、炭素数1～5のアルキル基又は炭素数1～3のヒドロキシアルキル基を表し；あるいは、R¹及びR²は、共同して炭素数3～5のアルキレン基を表し；R³は、水素原子、炭素数1～5のアルキル基、炭素数5～7のシクロアルキル基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、ベンジル基、ナフチル基、フェニル基、又は炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基を表す。)

で示されるピラズロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物を有効成分として含む、血液脳関門破綻抑制剤。

【請求項 2】 血液脳関門の透過性の増大を抑制する作用を有する、請求項 1 に記載の血液脳関門破綻抑制剤。

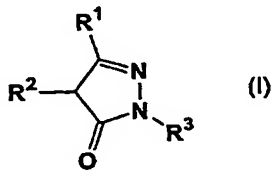
【請求項 3】 髄液中における炎症性サイトカインの量の増大を抑制する作用を有する、請求項 1 又は 2 に記載の血液脳関門破綻抑制剤。

【請求項 4】 式 (I) で示されるピラズロン誘導体が 3-メチル-1-フ

フェニル-2-ピラゾリン-5-オンである、請求項1から3の何れかに記載の血液脳関門破綻抑制剤。

【請求項5】 下記式 (I) :

【化2】



(式中、R¹は、水素原子、アリール基、炭素数1～5のアルキル基又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキル基を表し；R²は、水素原子、アリールオキシ基、アリールメルカプト基、炭素数1～5のアルキル基又は炭素数1～3のヒドロキシアルキル基を表し；あるいは、R¹及びR²は、共同して炭素数3～5のアルキレン基を表し；R³は、水素原子、炭素数1～5のアルキル基、炭素数5～7のシクロアルキル基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、ベンジル基、ナフチル基、フェニル基、又は炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基を表す。)

で示されるピラズロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物を有効成分として含む、多発性硬化症、髄膜炎、脳炎又は脳膿瘍の予防及び／又は治療のための医薬。

【請求項6】 式 (I) で示されるピラズロン誘導体が3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンである、請求項5に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ピラゾロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物を有効成分として含む血液脳関門破綻抑制剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

血液脳関門 (blood-brain barrier) とは、血液から脳組織内への物質の移行を制限する関門であり、これにより脳は有害物質から保護されている。ニコチン、カフェイン又はヘロインなどの脂溶性物質は血液脳関門を容易に通過できるが、極性物質又は強電解質などの非脂溶性物質は一般に血液脳関門を通過しにくい。一方、脳の代謝に必要なD-グルコース等の水溶性物質はキャリアーによって血液脳関門を透過して脳組織へ運ばれることが知られている。脳毛細血管においては、隣接する内皮細胞同士がタイト・ジャンクションと呼ばれる緊密な結合を形成し、細胞間の隙間から漏出しないようになっており、そのため、脳内に出入りする物質は原則として脳毛細血管内皮細胞を通過しなくてはならないとされている。上記のように、脳毛細血管内皮細胞は、脳への栄養物質だけでなく細胞膜に発現している種々の輸送系によって薬物を脳内へ輸送する。

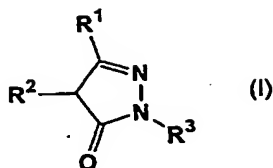
【0003】

多発性硬化症、髄膜炎、脳炎または脳膿瘍などの中枢神経系の炎症性疾患では血液脳関門が破綻しており、髄液中に存在する炎症性サイトカインであるTNF- α やIL-1 β が高値を示すことが報告されている (S.L. Hauser, et al., Cytokine accumulation in CSF of multiple sclerosis patients: frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor but not interleukin-6. Neurology, 40: 1735-1739 (1990))。

【0004】

一方、下記式 (I) :

【化3】



(式中、 R^1 は水素原子、アリール、炭素数1～5のアルキル又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキルを表し、 R^2 は、水素原子、アリールオキシ、アリールメルカプト、炭素数1～5のアルキル又は1～3のヒドロキシアルキルを表し、あるいは、 R^1 及び R^2 は、共同して炭素数3～5のアルキレンを表し、 R^3 は水素原子、炭素数1～5のアルキル、炭素数5～7のシクロアルキル、炭素数1～3のヒドロキシアルキル、ベンジル、ナフチル又はフェニル、又は炭素数1～5のアルコキシ、炭素数1～3のヒドロキシアルキル、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル、炭素数1～3のアルキルメルカプト、炭素数1～4のアルキルアミノ、総炭素数2～8のジアルキルアミノ、ハロゲン原子、トリフルオロメチル、カルボキシル、シアノ、水酸基、ニトロ、アミノ、及びアセトアミドからなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニルを表す。)で表されるピラズロン誘導体については、医薬の用途として、脳機能正常化作用(特許文献1参照)、過酸化脂質生成抑制作用(特許文献2参照)、抗潰瘍作用(特許文献3参照)、及び血糖上昇抑制作用(特許文献4参照)等が知られている。

【0005】

また、上記式(I)の化合物のうち、3-メチルー1-フェニルー2-ピラズリン-5-オンを有効成分とする製剤は、2001年6月以来、脳保護剤(一般名「エダラボン」、商品名「ラジカット」：三菱ウェルファーマ株式会社製造・販売)として上市されている。この「エダラボン」は、活性酸素に対して高い反応性を有することが報告されている(非特許文献1；非特許文献2参照)。このように、エダラボンは活性酸素をはじめとする種々のフリーラジカルを消去することで、細胞障害などを防ぐ働きをするフリーラジカルスカベンジャーである。しかしながら、これまでエダラボンが血液脳関門の破綻を抑制できるか否かの検

討については全く報告がない。

【0006】

【特許文献1】

特公平5-31523号公報

【特許文献2】

特公平5-35128号公報

【特許文献3】

特開平3-215425号公報

【特許文献4】

特開平3-215426号公報

【非特許文献1】

Kawai, H., et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 281(2), 921, 1997

【非特許文献2】

Wu, TW. et al., Life Sci, 67(19), 2387, 2000

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、血液脳関門破綻抑制剤を提供することにある。

【0008】

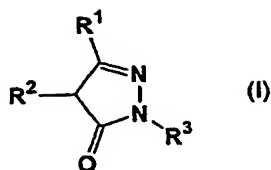
【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決することを目的として、インビトロおよびインビボの系を用いて、式(I)で示されるピラズロン誘導体が血液脳関門破綻を抑制する効果について検討した。その結果、上記ピラズロン誘導体の投与により、血液脳関門の破綻を抑制し、中枢神経系の炎症性疾患の患者の神経症状を緩和できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

即ち、本発明によれば、下記式(I)：

【化 4】



(式中、 R^1 は、水素原子、アリール基、炭素数1～5のアルキル基又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキル基を表し； R^2 は、水素原子、アリールオキシ基、アリールメルカプト基、炭素数1～5のアルキル基又は炭素数1～3のヒドロキシアルキル基を表し；あるいは、 R^1 及び R^2 は、共同して炭素数3～5のアルキレン基を表し； R^3 は、水素原子、炭素数1～5のアルキル基、炭素数5～7のシクロアルキル基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、ベンジル基、ナフチル基、フェニル基、又は炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシ基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基を表す。)

で示されるピラゾロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物を有効成分として含む、血液脳関門破綻抑制剤が提供される。

【0010】

本発明の好ましい態様によれば、血液脳関門の透過性の増大を抑制する作用を有する血液脳関門破綻抑制剤、並びに、髄液中における炎症性サイトカインの量の増大を抑制する作用を有する血液脳関門破綻抑制剤が提供される。

本発明の好ましい態様によれば、式(I)で示されるピラゾロン誘導体は3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物である。

【0011】

本発明の別の側面によれば、上記式 (I) で示されるピラズロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物を有効成分として含む、多発性硬化症、髄膜炎、脳炎又は脳膿瘍の予防及び／又は治療のための医薬が提供される。好ましい態様によれば、式 (I) で示されるピラズロン誘導体は 3-メチル-1-フェニル-2-ピラズリン-5-オンである。

【0012】

本発明のさらに別の局面によれば、上記式 (I) で示されるピラズロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物の有効量をヒトを含む哺乳動物に投与する工程を含む、血液脳関門破綻を抑制する方法；並びに、上記式 (I) で示されるピラズロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物の有効量をヒトを含む哺乳動物に投与する工程を含む、多発性硬化症、髄膜炎、脳炎又は脳膿瘍を予防及び／又は治療する方法が提供される。

【0013】

本発明のさらに別の側面によれば、血液脳関門破綻抑制剤の製造のための式 (I) で示されるピラズロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物の使用；並びに、多発性硬化症、髄膜炎、脳炎又は脳膿瘍の予防及び／又は治療のための医薬の製造のための式 (I) で示されるピラズロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物の使用が提供される。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明による血液脳関門破綻抑制剤、並びに多発性硬化症、髄膜炎、脳炎又は脳膿瘍の予防及び／又は治療のための医薬（以下、本発明の薬剤とも称する）は、本明細書に定義する式 (I) で示されるピラズロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物を含む。

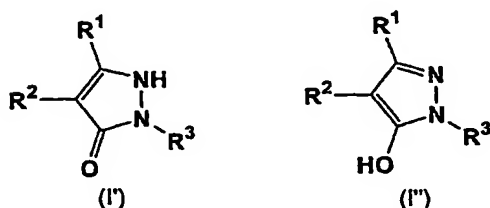
【0015】

本発明で用いる式 (I) で示される化合物は、互変異性により、以下の式 (I') 又は (I'') で示される構造をもとりうる。本明細書の式 (I) には、便宜

上、互変異性体のうちの1つを示したが、当業者には下記の互変異性体の存在は自明である。本発明の医薬の有効成分としては、下記の式(I')又は(I'')で表される化合物若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物を用いてもよい。

【0016】

【化5】



【0017】

式(I)において、R¹の定義におけるアリール基は単環性又は多環性アリール基のいずれでもよい。例えば、フェニル基、ナフチル基などのほか、メチル基、ブチル基などのアルキル基、メトキシ基、ブトキシ基などのアルコキシ基、塩素原子などのハロゲン原子、又は水酸基等の置換基で置換されたフェニル基等が挙げられる。アリール部分を有する他の置換基（アリールオキシ基など）におけるアリール部分についても同様である。

【0018】

R¹、R²及びR³の定義における炭素数1~5のアルキル基は直鎖状、分枝鎖状のいずれでもよい。例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基等が挙げられる。アルキル部分を有する他の置換基（アルコキシカルボニルアルキル基）におけるアルキル部分についても同様である。

【0019】

R¹の定義における総炭素数3~6のアルコキシカルボニルアルキル基としては、メトキシカルボニルメチル基、エトキシカルボニルメチル基、プロポキシカルボニルメチル基、メトキシカルボニルエチル基、メトキシカルボニルプロピル基等が挙げられる。

【0020】

R²の定義におけるアリールオキシ基としては、p-メチルフェノキシ基、p-メトキシフェノキシ基、p-クロロフェノキシ基、p-ヒドロキシフェノキシ基等が挙げられ、アリールメルカプト基としては、フェニルメルカプト基、p-メチルフェニルメルカプト基、p-メトキシフェニルメルカプト基、p-クロロフェニルメルカプト基、p-ヒドロキシフェニルメルカプト基等が挙げられる。

【0021】

R²及びR³の定義における炭素数1~3のヒドロキシアルキル基としては、ヒドロキシメチル基、2-ヒドロキシエチル基、3-ヒドロキシプロピル基等が挙げられる。R³の定義における炭素数5~7のシクロアルキル基としては、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基等が挙げられる。

【0022】

R³の定義において、フェニル基の置換基における炭素数1~5のアルコキシ基としては、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、ブトキシ基、ペンチルオキシ基等が挙げられ、総炭素数2~5のアルコキシカルボニル基としては、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、プロポキシカルボニル基、ブトキシカルボニル基等が挙げられ、炭素数1~3のアルキルメルカプト基としては、メチルメルカプト基、エチルメルカプト基、プロピルメルカプト基等が挙げられ、炭素数1~4のアルキルアミノ基としては、メチルアミノ基、エチルアミノ基、プロピルアミノ基、ブチルアミノ基等が挙げられ、総炭素数2~8のジアルキルアミノ基としては、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、ジプロピルアミノ基、ジブチルアミノ基等が挙げられる。

【0023】

本発明の薬剤の有効成分として好適に用いられる化合物（I）として、例えば、以下に示す化合物が挙げられる。

3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン；

3-メチル-1-(2-メチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン；

3-メチル-1-(3-メチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン；

3-メチル-1-(4-メチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン；

3-メチル-1-(3,4-ジメチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン

;

1-(4-エチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

3-メチル-1-(4-プロピルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン;

1-(4-ブチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

1-(3-トリフルオロメチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

【0024】

1-(4-トリフルオロメチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

1-(2-メトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

1-(3-メトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

1-(4-メトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

1-(3,4-ジメトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

1-(4-エトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

3-メチル-1-(4-プロポキシフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン;

1-(4-ブトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

1-(2-クロロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

1-(3-クロロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

1-(4-クロロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

1-(3,4-ジクロロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

;

【0025】

1-(4-ブromoフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

1-(4-フルオロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

1-(3-クロロ-4-メチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

1-(3-メチルメルカプトフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-

オン;

1-(4-メチルメルカプトフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-

オン;

4-(3-メチル-5-オキソ-2-ピラゾリン-1-イル)安息香酸;

1-(4-エトキシカルボニルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-

-オン;

1-(4-ニトロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

3-エチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン;

1-フェニル-3-プロピル-2-ピラゾリン-5-オン;

【0026】

1, 3-ジフェニル-2-ピラゾリン-5-オン;

3-フェニル-1-(p-トリル)-2-ピラゾリン-5-オン;

1-(4-メトキシフェニル)-3-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン;

1-(4-クロロフェニル)-3-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン;

3, 4-ジメチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン;

4-イソブチル-3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン;

4-(2-ヒドロキシエチル)-3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン;

3-メチル-4-フェノキシ-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン;

3-メチル-4-フェニルメルカプト-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン;

【0027】

3, 3', 4, 5, 6, 7-ヘキサヒドロ-2-フェニル-2H-インダゾール-3-オン;

3-(エトキシカルボニルメチル)-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン;

1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン;

3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

1, 3-ジメチル-2-ピラゾリン-5-オン;

- 1-エチル-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;
- 1-ブチル-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;
- 1-(2-ヒドロキエチル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;
- 1-シクロヘキシル-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;
- 1-ペンジル-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

【0028】

- 1-(α -ナフチル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;
- 1-メチル-3-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン;
- 3-メチル-1-(4-メチルフェニル)-2-ピラゾリン-5-オン;
- 1-(4-ブチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;
- 1-(4-メトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;
- 1-(4-ブトキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;
- 1-(4-クロロフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;
- 1-(4-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;
- 1-(3, 4-ジヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;
- 1-(2-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;
- 1-(3-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

【0029】

- 1-(4-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;
- 1-(3, 4-ヒドロキシフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;
- 1-(4-ヒドロキシフェニル)-3-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン;
- 1-(4-ヒドロキシメチルフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;
- 1-(4-アミノフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;
- 1-(4-メチルアミノフェニル)-3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン;

- 1- (4-エチルアミノフェニル) - 3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン
;
1- (4-ブチルアミノフェニル) - 3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン
;
1- (4-ジメチルアミノフェニル) - 3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン
;
1- (アセトアミドフェニル) - 3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン; 及び
1- (4-シアノフェニル) - 3-メチル-2-ピラゾリン-5-オン

【0030】

本発明の薬剤の有効成分としては、式 (I) で表される遊離形態の化合物のほか、生理学的に許容される塩を用いてもよい。生理学的に許容される塩としては、塩酸、硫酸、臭化水素塩、リン酸等の鉱酸との塩; メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、酢酸、グリコール酸、グルクロン酸、マレイン酸、フマル酸、シュウ酸、アスコルビン酸、クエン酸、サリチル酸、ニコチン酸、酒石酸等の有機酸との塩; ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属との塩; マグネシウム、カルシウム等のアルカリ土類金属との塩; アンモニア、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、N, N-ビス (ヒドロキシエチル) ピペラジン、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール、エタノールアミン、N-メチルグルタミン、L-グルタミン等のアミンとの塩が挙げられる。また、グリシンなどのアミノ酸との塩を用いてもよい。

【0031】

本発明の薬剤の有効成分としては、上記式 (I) で表される化合物若しくはその生理学的に許容される塩の水和物、又は上記式 (I) で表される化合物若しくはその生理学的に許容される塩の溶媒和物を用いてもよい。溶媒和物を形成する有機溶媒の種類は特に限定されないが、例えば、メタノール、エタノール、エーテル、ジオキサン、テトラヒドロフランなどを例示することができる。また、上記式 (I) で表される化合物は、置換基の種類により 1 以上の不斉炭素を有する場合があり、光学異性体又はジアステレオ異性体などの立体異性体が存在する場

合がある。本発明の医薬の有効成分としては、純粋な形態の立体異性体、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体などを用いてもよい。

【0032】

式 (I) で表される化合物はいずれも公知の化合物であり、特公平 5-31523 号公報などに記載された方法により当業者が容易に合成できる。

【0033】

本発明の薬剤の投与量は特に限定されないが、通常は、有効成分である式 (I) で示される化合物の重量として一般に経口投与の場合には一日あたり 0.1~100 mg/kg 体重、好ましくは一日あたり 0.5~50 mg/kg 体重、であり、非経口投与の場合には一日あたり 0.01~100 mg/kg 体重、好ましくは 0.1~10 mg/kg 体重である。上記投与量は 1 日 1 回又は 2~3 回に分けて投与するのが好ましく、年齢、病態、症状により適宜増減してもよい。

【0034】

本発明の薬剤としては、上記式 (I) で表される化合物若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物をそのまま投与してもよいが、一般的には、有効成分である上記の物質と薬理学的及び製剤学的に許容される添加物を含む医薬組成物を調製して投与することが好ましい。

【0035】

薬理学的及び製剤学的に許容しうる添加物としては、例えば、賦形剤、崩壊剤ないし崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、色素、希釈剤、基剤、溶解剤ないし溶解補助剤、等張化剤、pH 調節剤、安定化剤、噴射剤、及び粘着剤等を用いることができる。

【0036】

経口投与に適する医薬組成物には、添加物として、例えば、ブドウ糖、乳糖、D-マンニトール、デンプン、又は結晶セルロース等の賦形剤；カルボキシメチルセルロース、デンプン、又はカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤又は崩壊補助剤；ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、又はゼラチン等の結合剤；ステアリン酸マグネシウム又はタルク等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖

、ポリエチレングリコール又は酸化チタン等のコーティング剤；ワセリン、流動パラフィン、ポリエチレングリコール、ゼラチン、カオリン、グリセリン、精製水、又はハードファット等の基剤を用いることができる。

【0037】

注射あるいは点滴用に適する医薬組成物には、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール等の水性あるいは用時溶解型注射剤を構成しうる溶解剤又は溶解補助剤；ブドウ糖、塩化ナトリウム、D-マンニトール、グリセリン等の等張化剤；無機酸、有機酸、無機塩基又は有機塩基等のpH調節剤等の添加物を用いることができる。

【0038】

本発明の薬剤の形態は特に限定されず、当業者に利用可能な種々の形態をとることができる。経口投与に適する薬剤として、例えば、固体の製剤用添加物を用いて錠剤、散剤、顆粒剤、硬ゼラチンカプセル剤、坐剤、又はトローチ剤などを調製することができ、液状の製剤用添加物を用いてシロップ剤、乳剤、軟ゼラチンカプセル剤などを調製することができる。また、非経口投与に適する医薬として、注射剤、点滴剤、吸入剤、坐剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤などを調製することができる。なお、上記の式(I)の化合物を有効成分とする脳保護剤（点滴剤）が、すでに臨床において使用されているので（一般名「エダラボン」、商品名「ラジカット」：三菱ウェルファーマ株式会社製造・販売）、本発明の医薬において上記市販製剤をそのまま用いることができる。

【0039】

本発明の薬剤は、中枢神経系の炎症性疾患における血液脳関門の破綻を抑制するのに有効である。中枢神経系の炎症性疾患としては、多発性硬化症、髄膜炎、脳炎および脳膿瘍などが挙げられ、特に好ましくは多発性硬化症および髄膜炎である。本発明の薬剤は好ましくは、血液脳関門の透過性の増大を抑制する作用、並びに髄液中における炎症性サイトカインの量の増大を抑制する作用を発揮することができる。

【0040】

本発明の薬剤の投与経路は特に限定されず、経口的又は非経口的に投与するこ

とができる。非経口投与の投与経路も特に限定されず、静脈内、筋肉内、皮内、皮下に注射投与することができる。

【0041】

また、本発明の薬剤は、血液脳関門の破綻に先立って予防的に投与しておくことができる。また、血液脳関門の破綻を起こした患者に対しては、症状の悪化の防止ないしは症状の軽減などを目的として、本発明の薬剤を該患者に投与することができる。

【0042】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記の実施例により限定されるものではない。

【0043】

合成例：3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン（以下、エダラボンと称す）の合成

エタノール 50 ml 中にアセト酢酸エチル 13.0 g 及びフェニルヒドラジン 10.8 g を加え、3 時間還流撹拌した。反応液を放冷後、析出した結晶をろ取り、エタノールより再結晶して、表題の化合物 11.3 g を無色結晶として得た。

収率 67%

融点 127.5 ~ 128.5 °C

【0044】

実施例 1：血液脳関門共培養モデルを用いたエダラボンの血液脳関門破綻抑制作用の評価

(1) 血液脳関門共培養モデルの作製

血液脳関門共培養モデルは既報の方法で作製した (Eur. J. Pharm. Sci., 12:215-222, 2001)。具体的には、脳微小毛細血管内皮細胞とラットアストロサイトを単離し、Transwell TM フィルターの両面に培養させて共培養モデルを作製した。以下、その方法を説明する。

【0045】

脳毛細血管をウシ脳から単離した。髄膜および白質を除去し、灰白質を10%胎児ウシ血清を添加したDMEM (DMEM+S) に回収した。血管断片をWheatonホモジナイザーを用いて手動ホモジナイズにより調製し、150 μ mのナイロンメッシュ上に捕捉した。血管を、DMEM+S中においてコラゲナーゼ、トリプシン及びDNase Iで37℃で1時間消化し、200 μ mのナイロンメッシュで濾過した。脳毛細血管画分は、凍結混合物 (10% DMSOを含む胎児ウシ血清 (FCS)) 中に再懸濁し、-80℃で保存した。

【0046】

アストロサイトは新生Wisterラット (Harlan, Zeist, The Netherlands) から単離した。単離した皮質を断片化し、DMEM中トリプシン-EDTAとともに37℃でインキュベートした。懸濁物を120及び45 μ mのナイロンメッシュでそれぞれ濾過し、プラスチック組織培養フラスコ (Greiner, Alphen a/d Rijn, The Netherlands) 中でDMEM+S中で37℃10%CO₂下で3日間培養した。その後、培地は2日毎に交換した。コンフルエントの時点で、培養物は1:3の分割比でポリ-D-リジン被覆フラスコにトリプシン-EDTAを用いて継代し、再度コンフルエントまで生育させた。次いで、アストロサイト馴化培地を1日おきに2週間回収し、液体窒素中にて凍結混合物中に保存した。

【0047】

脳毛細血管を、IV型コラーゲン及びフィブロネクチンを被覆したプラスチック組織培養フラスコに播種し、4時間接着させた。その後、培地を増殖培地 (50% (v/v) アストロサイト馴化培地および125 μ g/mlヘパリンを加えたDMEM+S) に交換し、成長する細胞 (主として脳毛細血管内皮細胞、若干の周皮細胞) を37℃で10%CO₂下で培養した。

【0048】

インビトロ血液脳関門モデルは、IV型コラーゲン被覆Transwellポリカーボネートフィルター (表面積0.33 cm²; 孔径0.4 μ m; Corning Costar, Cambridge, MA, USA) 上に調製した。約70%コンフルエント (脳毛細血管の播種の4又は5日後) の時点で、脳毛細血管内皮細胞をトリプシン-EDTAで約1分間処理し、周皮細胞は下層に付着させたままにした。アストロサイトを45

、000細胞／フィルターの密度でフィルターの底に播種することによって、脳毛細血管内皮細胞およびアストロサイトの共培養物を調製した。アストロサイトをフィルターの底に10分間接着させ、その2又は3日後に脳毛細血管内皮細胞を継代した。脳毛細血管内皮細胞は30,000細胞／フィルターの密度で播種した。脳毛細血管内皮細胞とアストロサイトの共培養物を、最初の2又は3日間は125 μ g/mlのヘパリンを補充したDMEM+Sで、そして最後の2又は3日間はDMEM+S又は分化培地（即ち、5 μ g/mlのアポトランスフェリン、8 μ g/mlのブトレッシン、2.5 μ g/mlの亜セレン酸ナトリウム、312.5 μ Mの8-（4-クロロフェニルチオ（CPT））-cAMP、17.5 μ MのRO-20-1724、及び1 μ Mの全トランス型レチノイン酸を補充したDMEM+S）で緊密な単層になるまで培養した。脳毛細血管内皮細胞の単層も同様に培養したが、50%（v/v）アストロサイト馴化培地を培地に添加した。

【0049】

作製した共培養モデルの概要を図1の左図に示す。作製した共培養モデルにおけるフルオレッセインナトリウム拡散速度とTEER（Transcellular endothelial electrical resistance）との相関を図1の右図に示す。TEERはミリポア社ミリセル－ERS（カタログ番号：MERS00001）で測定した。

【0050】

（2）TEERに対するTNF α およびIL1 β の影響

上記の血液脳関門共培養モデルを用いて、細胞に、TNF α （50 ng/mL）および／またはIL-1 β （5 ng/mL）を加え、透過性をTEERとしてミリポア社ミリセル－ERS（カタログ番号：MERS00001）で測定した。TNF α およびIL-1 β はTranswellTMフィルターのBBB共培養モデルの基底外側に添加した。結果（n=3、平均±SEM、*P<0.05）を図2に示す。図2の結果から分かるように、TNF α （50 ng/mL）および／またはIL1 β （5 ng/mL）を加えることにより、TEERは有意に減少した。

【0051】

（3）NF- κ B阻害薬、iNOS阻害薬及びエダラボンによるTEER減少か

らの回復

細胞に、NF- κ B 阻害薬である BAY11-7082 (CALBIOCHEM 社) ($10\text{ }\mu\text{M}$) 又は α -MSH (Sigma 社) ($1\text{ }\mu\text{M}$)、iNOS 阻害薬である 1400W (CALBIOCHEM 社) (0.5 nM) 又は エダラボン ($10\text{ }\mu\text{M}$) の存在下において、TNF α (50 ng/mL) および/または IL1 β (5 ng/mL) を加え、透過性を TEER として ミリポア社 ミリセル-ERS (カタログ番号: MERS00001) で測定した。また、培養液中の NO を グリース法で測定した。

【0052】

結果 (各実験について、 $n=3$ 、平均 \pm SEM、* $P<0.05$) を図3から図5に示す。図3は、TEER に対する NF- κ B 阻害薬および iNOS 阻害薬の効果を示す。図4は、NO 産生量に対する NF- κ B 阻害薬および iNOS 阻害薬の効果を示す。図5は、TEER に対する エダラボンの効果を示す。図3～図5の結果から分かるように、NF- κ B 阻害薬、iNOS 阻害薬又は エダラボンを添加することにより、TNF α または IL1 β による TEER 減少を回復させることができた。

【0053】

実施例2：実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルを用いた エダラボンの血液脳関門破綻抑制作用の評価

EAE (実験的自己免疫性脳脊髄炎) モデルラットを既存の方法に従い作製した (Int. J. immunopharmacol, 7:497-503, 1995)。まず、等量の モルモット 脊髄、無菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 及び不完全フロイントアジュバンドから成る脳炎誘発性エマルジョンを調製し、 10 mg/mL の Mycobacterium tuberculosis H37Ra (Difco Laboratories) を補充した。これを、各ラット (近交系雄 Lewis ラット、体重 $200\sim 250\text{ g}$) の両後肢足蹠に皮下投与により 0.1 mL ずつ接種することにより、EAE モデルラットを作製した。対照ラットには、脊髄なしのエマルジョンを接種した。

【0054】

対照ラットおよび EAE モデルラットについて エダラボンを投与した場合と投与しない場合について、血漿および髄液中の TNF α 及び IL-1B の濃度、髄

液／血漿タンパク質比、並びに血液脳関門透過性（20分目におけるフルオレセインナトリウム静注の脳／血漿濃度（ $K_{p, app}$ ）を測定した。 $K_{p, app}$ はapparent distribution ratioを示し、フルオレセイン静脈内投与後の脳組織中濃度を血漿中濃度で割った値（ $\times 100$ により％表示）である。なお、脳組織の比重は1として換算している（濃度の単位が/g 組織重量のため）。エダラボンの投与量は3 mg/kg/日（腹腔内投与）とし、感作（抗原溶液の投与）10日後から24時間おきに3日間（＝感作10日後、11日後、12日後の3回）投与した。結果（各実験について、 $n = 3$ 、平均 \pm SEM、* $P < 0.05$ ）を図6および図7に示す。

【0055】

図6および図7の結果から分かるように、EAEモデルラットでは対照ラットと比較して、髄液中のTNF α 及びIL-1Bの濃度が上昇し、髄液／血漿タンパク質比が上昇し、また血液脳関門透過性（フルオレセインナトリウム静注脳／血漿濃度）も上昇した。しかし、図7の結果から分かるように、これらの作用は、エダラボンの投与により抑制されることが実証された。

【0056】

また、EAEモデルラットにおいて薬剤を投与しない群（コントロール）、デキサメタゾン（1 mg/kg/日、腹腔内投与）を投与した群、及びエダラボン（3 mg/kg/日、腹腔内投与）を投与した群について、肢神経麻痺スコアを評価した。肢神経麻痺スコアは、以下の基準で評価した。

【0057】

【表1】

表1：EAEラットにおけるPaulの臨床スコア

スコア	神経症状
0	正常
1	尾のたるみ及び歩行運動失調
2	後肢の部分的麻痺
3	失禁を伴う後肢の完全な麻痺
4	肢の完全な麻痺

【0058】

評価の結果（各実験について、 $n=3$ 、平均 \pm SEM、 $*P<0.05$ ）を図8に示す。図8の結果から分かるように、EAEモデルラットにおける肢神経麻痺スコアは、エダラボンの投与によりデキサメタゾンの投与の場合と同様に回復した。

【0059】

上記した実施例1および実施例2の結果から、エダラボンは血液脳関門システムを保護して、多発性硬化症モデルでの神経症状を保護できることが実証された。

【0060】

【発明の効果】

本発明の薬剤は、中枢神経系の炎症性疾患における血液脳関門破綻を抑制するために有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、血液脳関門共培養モデルの概要（左の図）、並びに、作製した共培養モデルにおけるフルオレッセインナトリウム拡散速度とTEER（Transcellar endothelial electrical resistance）との相関（右の図）を示す。図1において、PSendoは内皮細胞層におけるフルオレセインの透過クリアランスを示す。トランスウェルのapical側（内皮細胞の側）のメディウム中にフルオレセインを添加して、basolateral側（アストロサイトの側）のメディウムへのフルオレセインの透過を観測している。一定時間までにbasolateral側に透過したフルオレセイン量を、apical側メディウム中フルオレセイン濃度で割った値である。実験上は内皮細胞層+トランスウェルのフィルター+アストロサイトの各層を合わせたトータルの透過クリアランス（PStotal）が測定されるため、トランスウェルのフィルターにアストロサイトだけを培養した場合の透過クリアランス（PSastro+filter）も同時に用いて補正している。補正式： $1/PStotal = 1/PSendo + 1/PSastro+filter$ 。

【図2】

図 2 は、TEER に対する $\text{TNF } \alpha$ (tumor necrosis factor α) および $\text{IL } 1 \beta$ (interleukin-1 β) の影響を調べた結果を示す。

【図 3】

図 3 は、TEER に対する $\text{NF} - \kappa \text{B}$ (nuclear factor- κB) 阻害薬および iNOS (inducible nitric oxide synthase) 阻害薬の効果を示す。 $\alpha\text{-MSH}$ は α melanocyte-stimulating hormone を示す。

【図 4】

図 4 は、 NO 産生量に対する $\text{NF} - \kappa \text{B}$ 阻害薬および iNOS 阻害薬の効果を示す。

【図 5】

図 5 は、TEER に対するエダラボンの効果を示す。

【図 6】

図 6 は、EAE ラットにおける $\text{TNF } \alpha$ と $\text{IL} - 1 \beta$ の量並びに BBB 透過性を調べた結果を示す。

【図 7】

図 7 は、EAE ラットにおける $\text{TNF } \alpha$ と $\text{IL} - 1 \beta$ の量並びに BBB 透過性に対するエダラボンの効果を示す。CSF は脳脊髄液を示す。

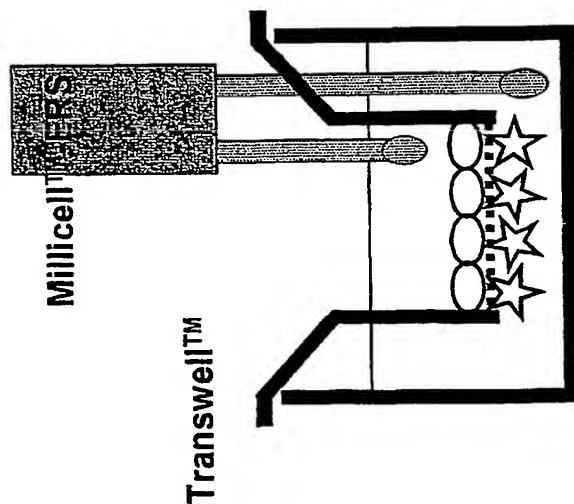
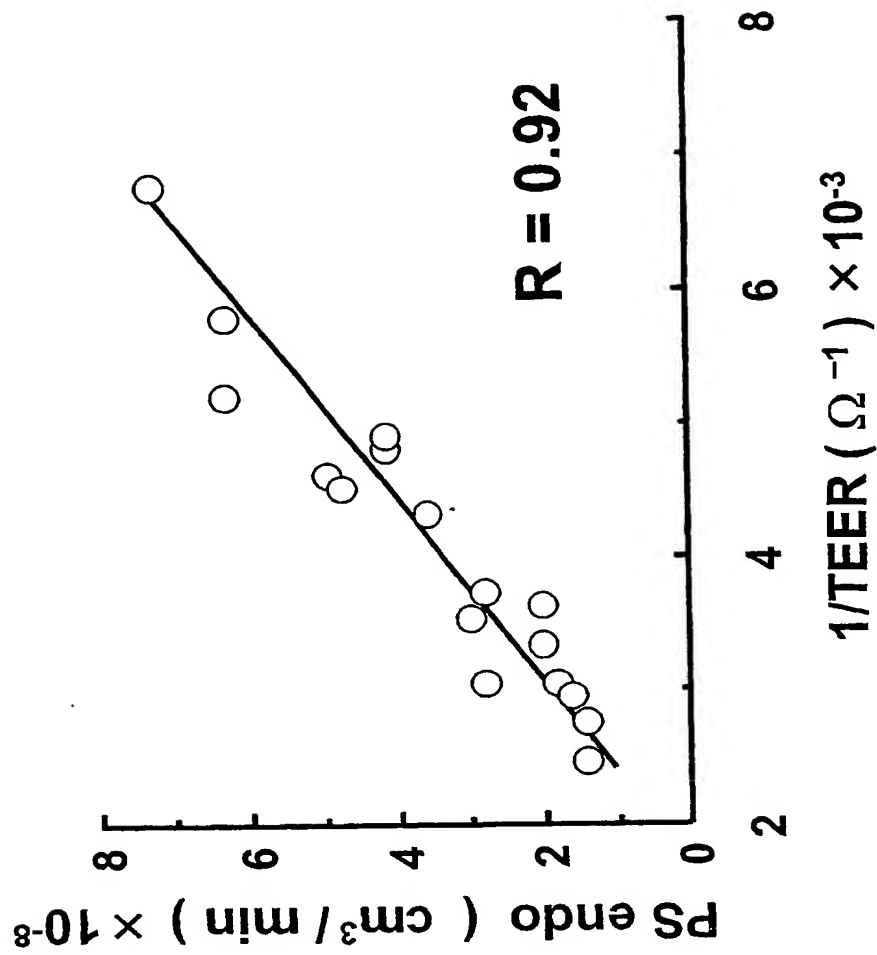
【図 8】

図 8 は、EAE モデルラットにおいて薬剤を投与しない群 (コントロール)、デキサメタゾン投与群、及びエダラボンを投与した群について、肢神経麻痺スコアを評価した結果を示す。i. p. は腹腔内投与を示す。

【書類名】

図面

【図 1】

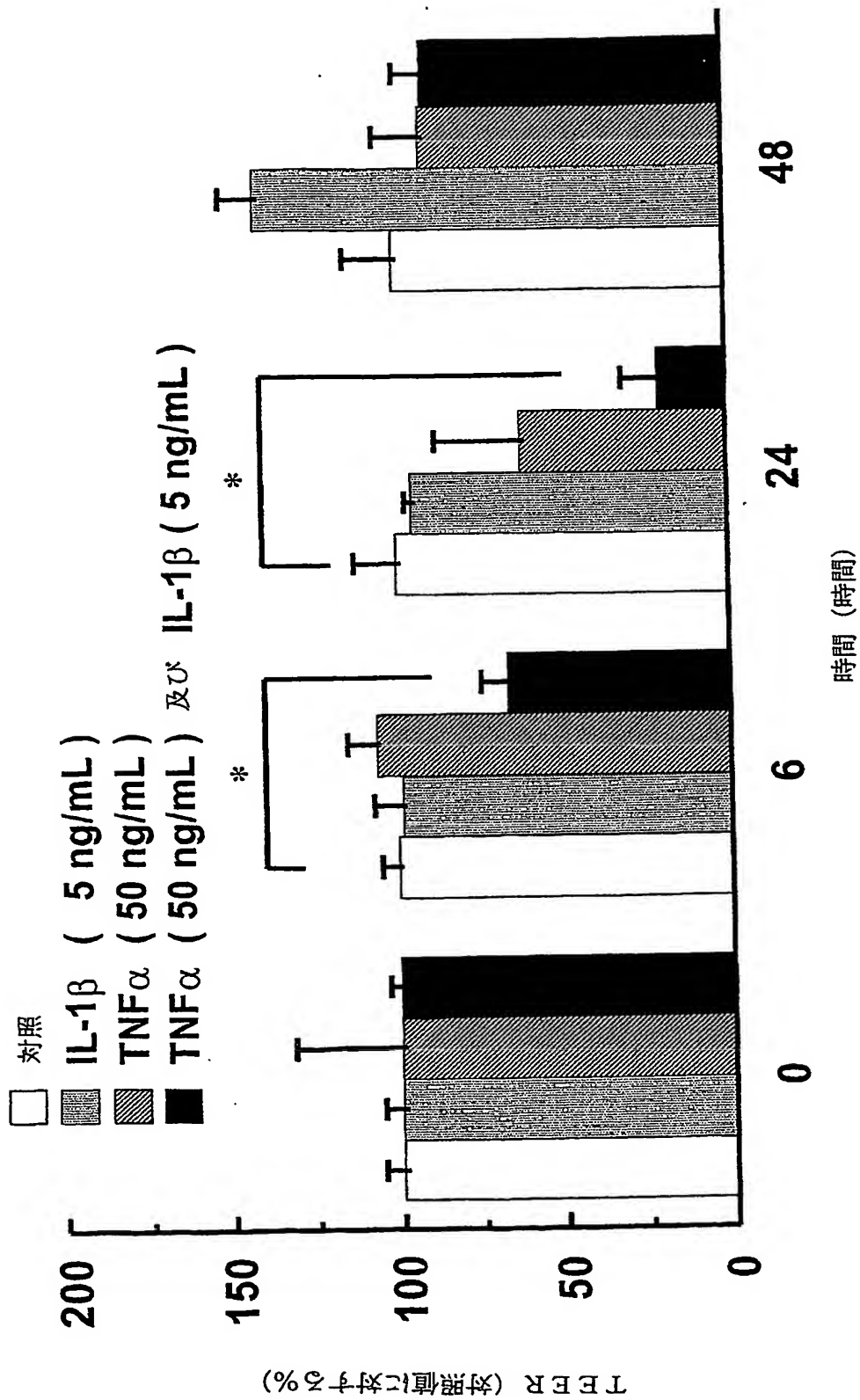


共培養物の性質

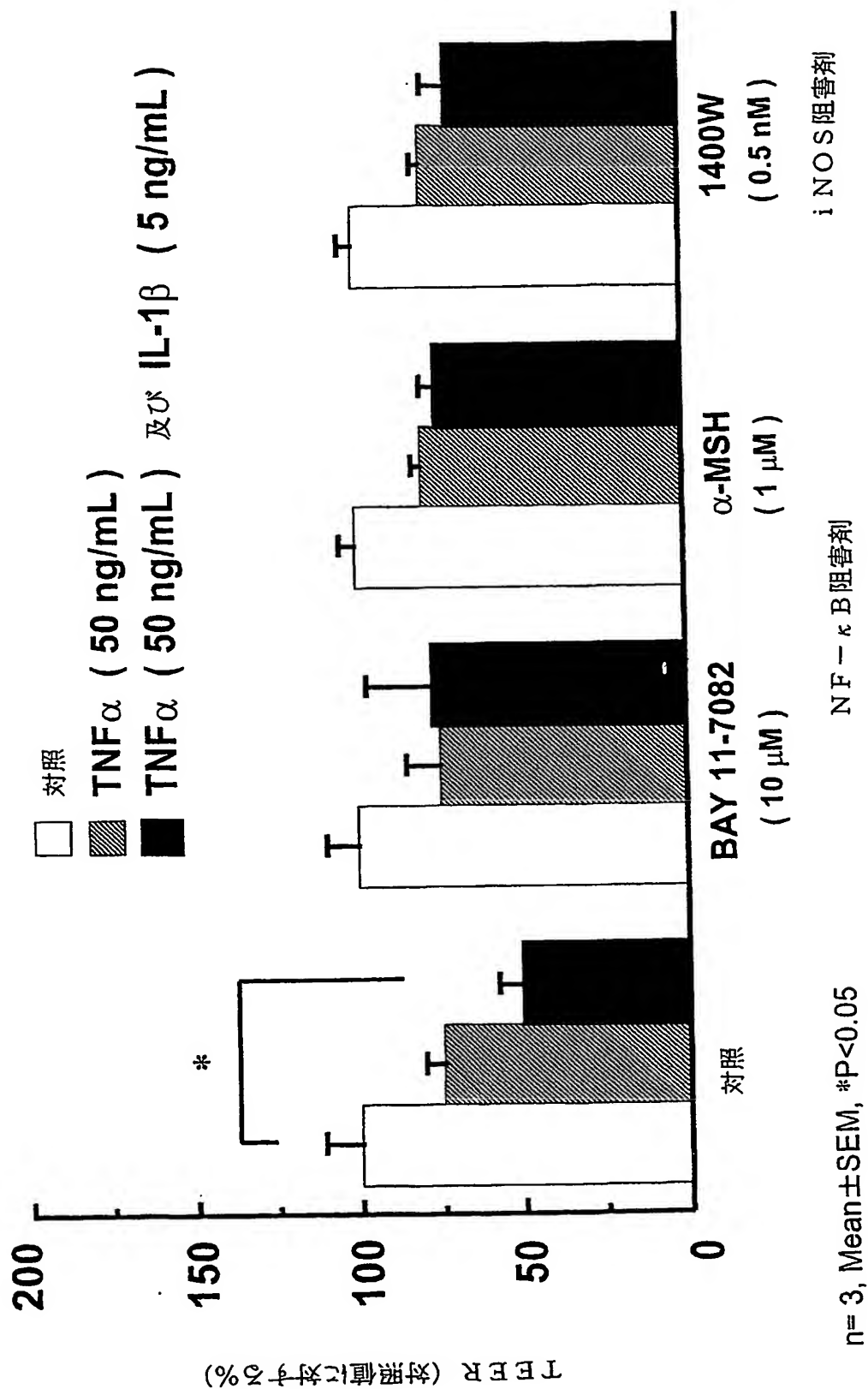
○: ウシ脳毛細血管内皮細胞

☆: ラットアストロサイト

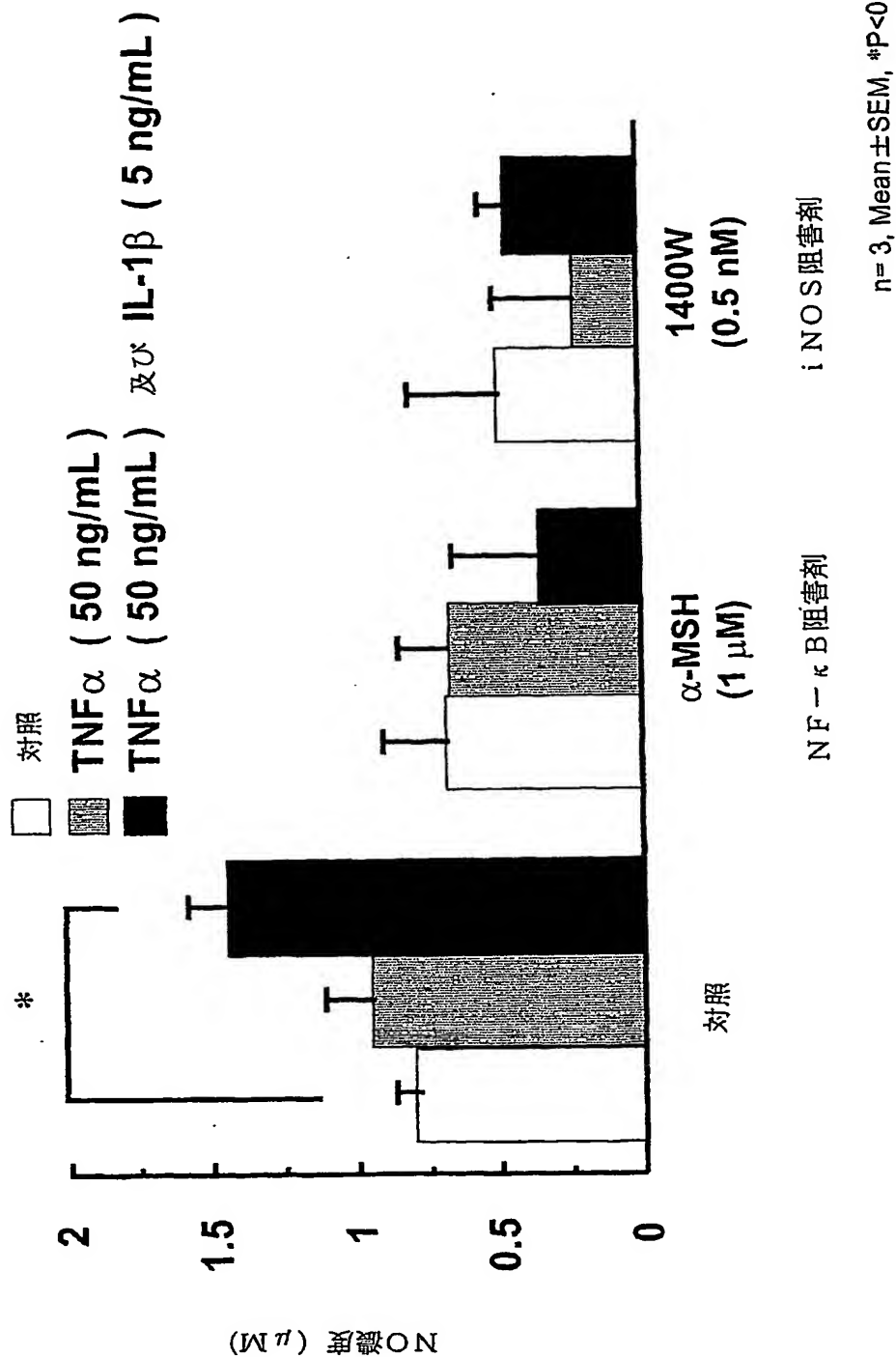
【図 2】



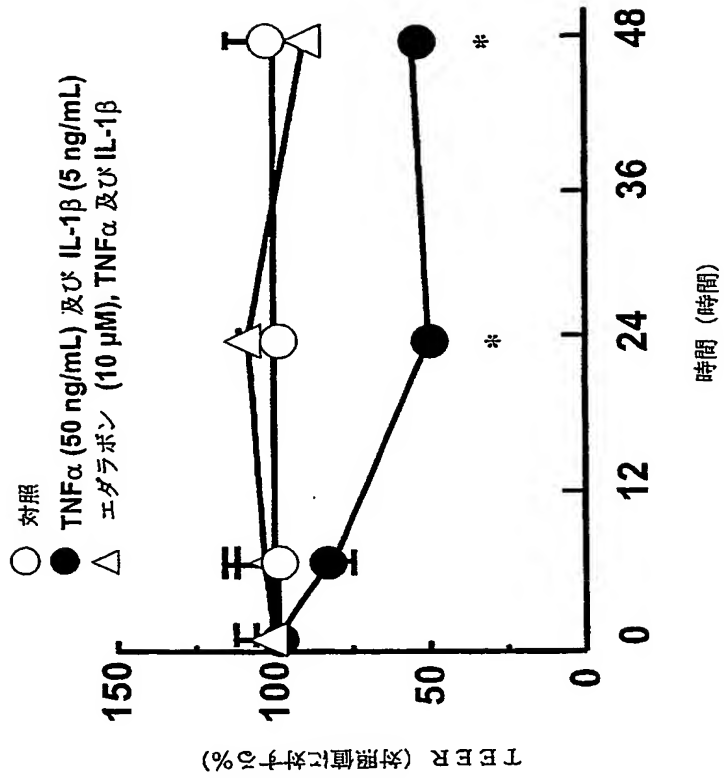
【図 3】



【図 4】



【図 5】

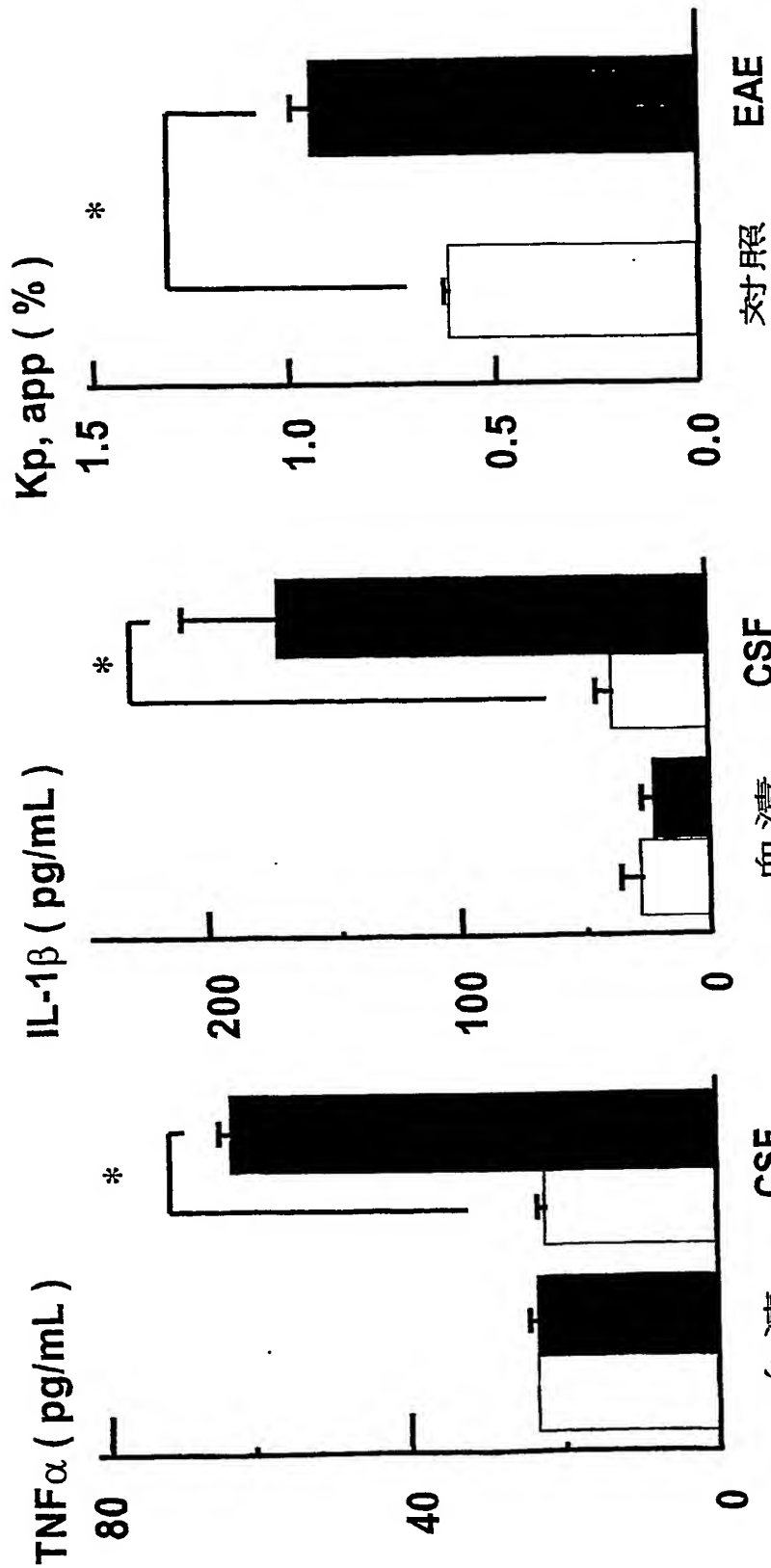


n=3, Mean±SEM, *P<0.05

【図 6】

□ 対照 ■ EAE

(B) BBB透過性

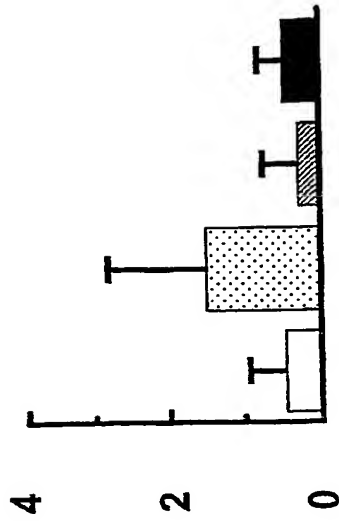


n = 3, Mean \pm SEM, *P < 0.05

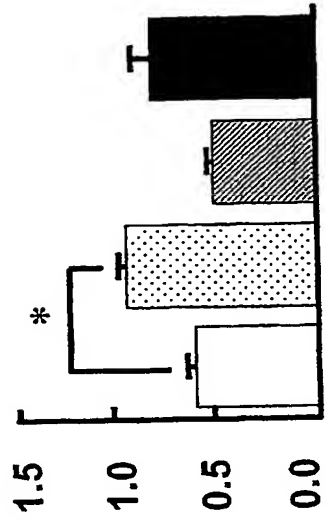
【図 7】

(B) BBB透過性

Protein in CSF/Serum (%)



Kp, app (%)

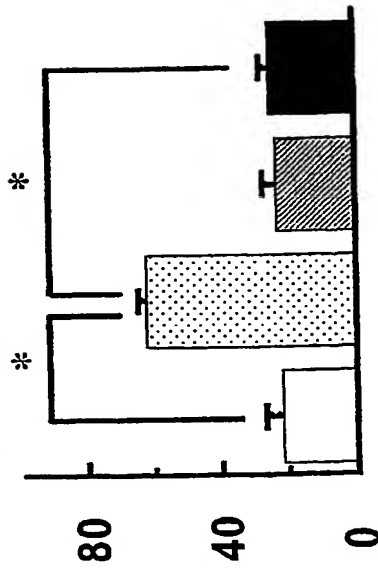


(-) エダラボン (+) エダラボン

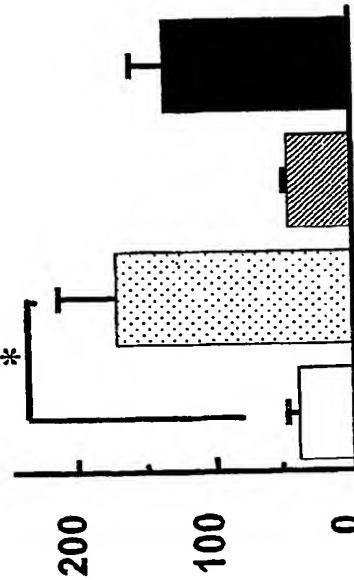
n=3, Mean±SEM, *P<0.05

(A) 炎症性サイトカイン

TNF α in CSF (pg/mL)



IL-1 β in CSF (pg/mL)

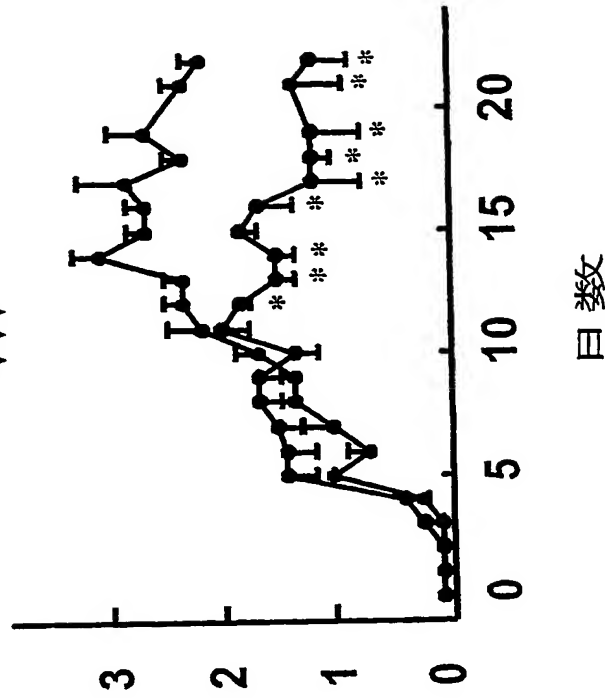


(-) エダラボン (+) エダラボン

【図 8】

(B) エデラボン

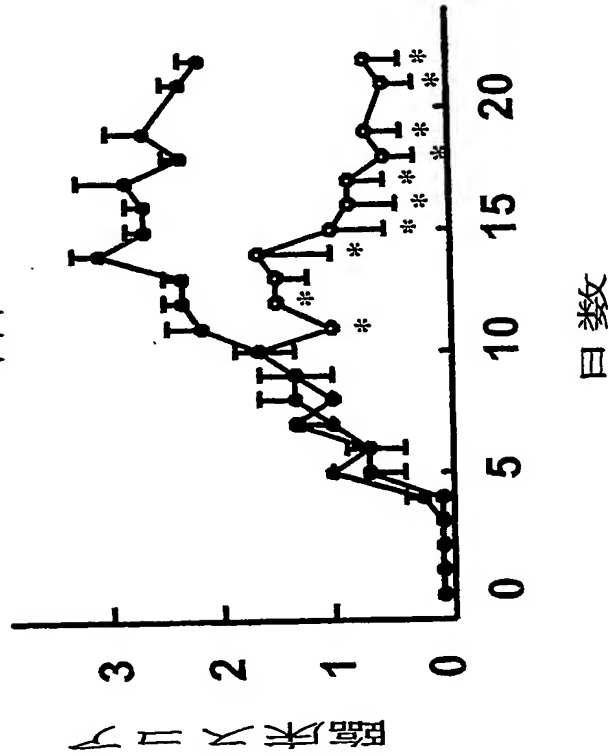
(3 mg/kg/day, i.p.)



n=3, Mean±SD, *p<0.05

(A) デキサメタゾン

(1 mg/kg/day, i.p.)



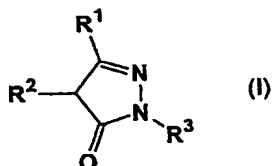
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 血液脳関門破綻抑制剤を提供すること。

【解決手段】 下記式 (I) :

【化 1】



(式中、R¹は、水素原子、アリール基、炭素数1～5のアルキル基又は総炭素数3～6のアルコキシカルボニルアルキル基を表し；R²は、水素原子、アリールオキシ基、アリールメルカプト基、炭素数1～5のアルキル基又は炭素数1～3のヒドロキシアルキル基を表し；あるいは、R¹及びR²は、共同して炭素数3～5のアルキレン基を表し；R³は、水素原子、炭素数1～5のアルキル基、炭素数5～7のシクロアルキル基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、ベンジル基、ナフチル基、フェニル基、又は炭素数1～5のアルキル基、炭素数1～5のアルコキシ基、炭素数1～3のヒドロキシアルキル基、総炭素数2～5のアルコキシカルボニル基、炭素数1～3のアルキルメルカプト基、炭素数1～4のアルキルアミノ基、総炭素数2～8のジアルキルアミノ基、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、カルボキシル基、シアノ基、水酸基、ニトロ基、アミノ基及びアセトアミド基からなる群から選ばれる同一若しくは異なる1～3個の置換基で置換されたフェニル基を表す。)

で示されるピラズロン誘導体若しくはその生理学的に許容される塩、又はそれらの水和物若しくは溶媒和物を有効成分として含む、血液脳関門破綻抑制剤。

【選択図】 なし

特願 2003-004813

出願人履歴情報

識別番号

[000006725]

1. 変更年月日

2001年10月 1日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府大阪市中央区平野町2丁目6番9号

氏 名

三菱ウェルファーマ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.